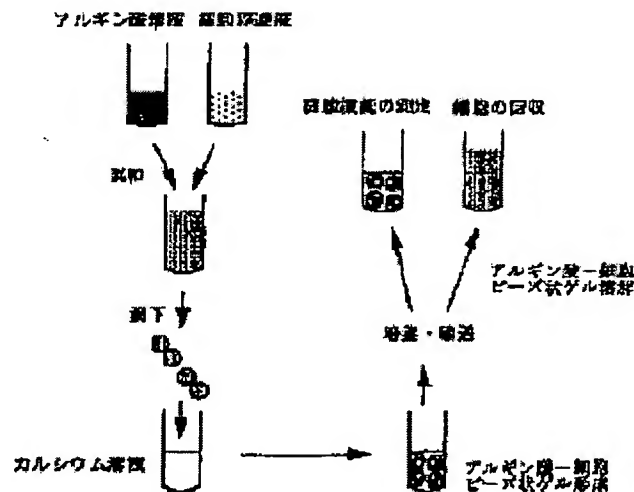


**CELL CULTURE****Publication number:** JP10248557**Publication date:** 1998-09-22**Inventor:** MATSUDA NAOKI; MORITA NAOKO; TAKESHITA TETSUSHI; YOKOYAMA KANEHISA; WATANABE MASAMI**Applicant:** KAGAKU GIJUTSU SHINKO JIGYODAN**Classification:****- international:** C12N5/06; C12N5/06; (IPC1-7): C12N5/06**- european:****Application number:** JP19970054388 19970310**Priority number(s):** JP19970054388 19970310[Report a data error here](#)**Abstract of JP10248557**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for culturing cells capable of easily culturing a large amount of the cells while maintaining functions of the cells without using any special apparatus, etc., by imbedding culturing cells in a bead-shaped alginic acid gel. **SOLUTION:** This method for culturing cells is to use a bead-shaped gel formed by alginic acid as a cell culturing carrier and imbed the culturing cells therein. The gel is useful for transporting the cultured cells and for a safe kit for examining medicinal effect by using the cultured cells. It is possible to prepare the bead-shaped alginic acid gel containing cells in the inside by mixing the cell suspension with alginic acid and dripping a calcium solution therein.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

**BEST AVAILABLE COPY**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-248557

(43) 公開日 平成10年(1998) 9月22日

(51) IntCl.<sup>6</sup>

C 1 2 N 5/06

識別記号

F I

C 1 2 N 5/00

E

審査請求 未請求 請求項の数6 OL (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平9-54388

(22) 出願日 平成9年(1997) 3月10日

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 松田 尚樹

長崎県大村市久原2丁目923-4

(72) 発明者 森田 直子

長崎県西彼杵郡長与町高田郷1074-24

(72) 発明者 竹下 哲史

長崎県長崎市小瀬戸町1006-2A-102

(72) 発明者 横山 兼久

長崎県大村市池田2丁目263-1-C-101

(72) 発明者 渡邊 正己

長崎県西彼杵郡三和町晴海台24-15

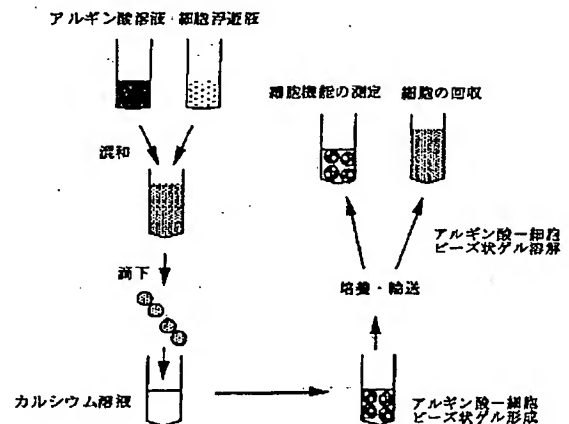
(74) 代理人 弁理士 田中 宏

(54) 【発明の名称】 細胞培養法

(57) 【要約】

【課題】 培養細胞の輸送や培養細胞を用いた薬効・安全性評価キット開発に有用な細胞培養法を提供することを目的とする。

【解決手段】 アルギン酸ビーズ状ゲル中に培養細胞を包埋し、しかる後該アルギン酸ビーズ状ゲルを溶解し再培養を行なうことを特徴とする細胞培養法である。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 アルギン酸ビーズ状ゲル中に培養細胞を包埋することを特徴とする細胞培養法。

【請求項2】 アルギン酸ビーズ状ゲル中に培養細胞を包埋し、しかる後該アルギン酸ビーズ状ゲルを溶解することを特徴とする細胞培養法。

【請求項3】 アルギン酸ビーズ状ゲルの溶解をカルシウムイオンの除去、またはアルギン酸分解のうち少なくとも1つの手段により行なうことを特徴とする請求項2記載の細胞培養法。

【請求項4】 カルシウムイオンの除去をカルシウムイオンのキレート剤により行なうことを特徴とする請求項3記載の細胞培養法。

【請求項5】 カルシウムイオンのキレート剤としてEDTA、EGTAのうち少なくとも1つを用いることを特徴とする請求項4記載の細胞培養法。

【請求項6】 アルギン酸分解をアルギン酸分解酵素であるポリ(β-D-マンヌロネート)リアーゼにより行なうことを特徴とする請求項3記載の細胞培養法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、培養細胞の輸送や培養細胞を用いた薬効・安全性評価キット開発に有用な細胞培養法に関する。

## 【0002】

【従来技術】 培養細胞を用いた実験には、複雑な生命現象を個体から切り離したレベルで単純化して科学的に解析できること、ヒト細胞を用いることによりヒトにおける生命現象を直接解析できることなど、動物実験では成しえない多くの利点がある。そのため細胞培養技術は、薬剤開発、遺伝子治療法開発、さらには安全性試験の動物実験代替として幅広く用いられている。しかしながら、ある特定の培養細胞および機能評価法を用いた試験法として、産業的に標準化されているものは未だ限られている。その理由としては、同一の培養細胞を安定して輸送、供給することが困難であること、また培養細胞とその細胞機能評価法に必要な材料を組みあわせキット化して供給する方法が開発されていないことが挙げられる。

【0003】 たとえば、これまで培養細胞の輸送法としては、液体窒素中にアンプルに凍結保存した細胞を低温輸送する方法、もしくは培養フラスコに培養液を充滿させて常温で輸送する方法が用いられてきた。しかし、前者の方法は輸送コストが高い上、凍結しても生存率や活性が低下しない細胞に限られるため、肝細胞など特徴的な機能を保持した初代培養細胞の輸送には適さない。後者の方法では、フラスコのサイズに依存して運べる細胞数に限度があるため輸送効率が悪く、また破損の危険性もあるため取り扱いに注意を要する。またそのようにして輸送された細胞を実験に用いるには、凍結細胞の場合

にはまず通常の培養条件である37℃で回復培養を行ない、その後、必要とする実験に応じた条件で再度培養する必要がある。常温輸送の場合にも、実験に必要な細胞数を得るために継代培養を行ない、その後実験に供するのが常である。そのため受領後ただちに同一条件の細胞を機能評価実験に用いることのできる細胞キットの開発は困難であった。

【0004】 大量の細胞を小さなスケールで効率的に培養し、そのままの形態で機能を保ちながら輸送することができれば、同一の培養細胞を安定して輸送、供給すること、またそのまま細胞機能評価に充分な細胞のキット化が可能である。このような手段に既知の技術を応用するとするならば、細胞を付着させるマイクロビーズを用いて有効付着面積を増加させる方法や、ゲル中に3次元的に密集して培養するという方法が考えられる。しかしながらビーズを用いる場合、ビーズ上に細胞を付着させるには特殊な装置を用いて長時間の培養が必要であるが、細胞が付着しやすいようなビーズ表面の加工が容易でないこと、また細胞の輸送中にビーズ同士が接触して損傷しやすいという欠点がある。ゲルを用いる場合、生体親和性が高いゲルであるコラーゲンゲルは高価であり、また細胞種によりコラーゲンの種類を変える必要があり、かつ輸送中の振動によりゲルが破損する可能性もある。温度感受性ゲルの細胞培養への応用も考えられるが、温度変化によるゲル物性の変化を最低限にいとめなくてはならない。以上のような理由のため、いずれの方法とも現実的ではない。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 そこで、本発明者らにはかかる事情に鑑み、細胞の機能をよく保持したまま大量の細胞を特別な機器等を必要とせず容易にかつ安価に培養する手法について種々検討した結果、意外にも藻類に多く含まれる多糖であるアルギン酸により形成されるビーズ状ゲルが、細胞培養担体として有用であることを見出し、本発明を完成したもので、本発明は細胞の機能を保持したままで特別な機器等を必要とせず容易にかつ安価に大量の細胞を培養し、且つ、培養細胞の輸送や培養細胞を用いた薬効・安全性評価キット開発に有用な細胞培養法する方法を提供することを目的とする。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 本願請求項1の発明の要旨は、アルギン酸ビーズ状ゲル中に培養細胞を包埋することを特徴とする細胞培養法であり、更に、培養細胞を包埋したアルギン酸ビーズ状ゲルを溶解することを特徴とする細胞培養法である。また、培養細胞を包埋したアルギン酸ビーズ状ゲルを溶解するに当り、カルシウムイオンの除去またはアルギン酸分解のうち少なくとも1つ手段によって行う。カルシウムイオンの除去手段としてはカルシウムのキレート剤を、あるいはアルギン酸分解にはアルギン酸分解酵素を使用することが好ましく、キ

レート剤としてはEDTA、EGTAのうち少なくとも1つを用い、また、アルギン酸分解酵素としてはポリ(β-D-マンヌロネート)リアーゼを使用することによって行なう。アルギン酸ビーズ状ゲルを溶解して回収した培養細胞は、必要に応じ更に再培養しても良い。

#### 【0007】

【発明の実施の形態】本発明について詳細に述べる。本発明においてアルギン酸水溶液はカルシウム溶液に滴下すると、アルギン酸を構成するグルコン酸のエッグボックス構造にカルシウムイオンが取り込まれることによりブロック共重合し、アルギン酸はゲル化して溶液中でビーズを形成する。ここで細胞浮遊液とアルギン酸をあらかじめ均等に混和した後、カルシウム溶液に滴下すると、細胞を内部に含んだアルギン酸ビーズ状ゲルを作成することができる。このようなアルギン酸ビーズ状ゲルの内部に細胞が取り込まれた状態を包埋という。このアルギン酸ビーズ状ゲルを少量の培養液中、37℃で培養すると、足場非依存性コロニー形成能を有する形質転換細胞の場合にはビーズ状ゲル内で増殖し、また正常細胞の場合にもその機能が安定に保たれる。培養フラスコのまま細胞を輸送した場合、輸送中の期間(24~48時間)は細胞が室温に晒される。ビーズ状ゲル内で48時間室温で放置された細胞の生存率は、培養フラスコで同様の条件で放置された細胞の生存率よりも高い。さらに肝細胞などの機能性細胞では、生体内環境に近い凝集体として三次元培養することにより、生体外でも長期にわたり機能発現を続けることが知られているが、本発明による培養法を用いれば、ビーズ状ゲル内で三次元的に培養された機能細胞をそのまま輸送し、目的の研究室に到着して温度回復後ただちに実験に使用することが可能である。一方、二次元的に増殖する付着性細胞の場合には、アルギン酸ビーズ状ゲルをカルシウムイオンのキレート剤またはアルギン酸分解酵素によって分解することにより容易に細胞を回収し、継代培養に供することができる。本発明の実施の形態を模式図として図1に示す。

【0008】アルギン酸は動物細胞には存在しないものであり、細胞の生存率や種々の機能にはまったく影響を及ぼさない。したがっていかなる細胞種に対しても使用可能である。またアルギン酸は藻類の構成成分として大量に存在するものであり、工業的にも安価に生産される。用いられるアルギン酸溶液濃度は随時決定できるが最終濃度0.5~0.75w/v%の範囲であればその操作性、ビーズ形成性が良好である。溶媒としてはカルシウムイオンを大量に含んでいないものであれば何れでも使用できるが、細胞によっては、培養実験一般に用いられるカルシウム不含リン酸緩衝塩類溶液(PBS(一))、あるいはイーグルMEMなどの合成培地を使用することが好ましい。カルシウムイオンは塩化カルシウム溶液などとして準備すれば良く、その濃度は0.5%~1.0w/v%の範囲を用いることが好ましい。これ

よりも高い濃度では細胞の存在率が、低い濃度ではビーズ形成性が影響を受ける可能性がある。溶媒としては一般の細胞であれば蒸留水で差し支えないが、培養環境の変化に敏感な初代培養系細胞の場合には生理食塩水など等張液を用いることもできる。

【0009】形成するビーズ状ゲルのサイズは、細胞とアルギン酸混合液を滴下する際に用いる器具先端の形状により決定される。すなわち小径のビーズ状ゲルを形成するには、細胞とアルギン酸混液をシリンジに吸引し、25G~19G程度の注射針を介して滴下する、あるいはマイクロピペットを用いて滴下するなどの方法がとられる。大径のビーズ状ゲルであれば、シリンジ先端から直接滴下、もしくはピペットを用いて滴下すれば良い。ビーズ状ゲル中で培養できる最大細胞数はこのビーズサイズに比例する。例えば、先端内径約1mmの1mlシリンジから0.5w/v%塩化カルシウム溶液に滴下された0.5%アルギン酸-細胞混液は直径約2mmのビーズ状ゲルを形成するが、HeLa細胞の場合、いかなる機能評価実験に対しても十分量と考えられる500万個までの細胞をこのサイズのビーズ状ゲル中に培養することができる。

【0010】細胞を含むビーズ状ゲルは瞬時に形成されるが、約30分間程度は37℃で静置することが後々の細胞生存性にとって好ましい。その後、カルシウム溶液を吸引等により除去し、通常の培養に用いる培養液と同一の培養液で洗浄する。この細胞はそのまま直ちに常温で輸送することも可能であるが、一昼夜37℃で培養した後に輸送すれば、細胞の生存率をより高く維持することができる。なお細胞の生存性のためにはビーズ状ゲルの表面を常に湿った状態に保っておく必要があるため、ビーズ状ゲルは滅菌チューブ中で培養液に浸した状態で輸送する。ビーズ形成直後、あるいは輸送後のビーズ状ゲル内培養を継続する際には、通常の炭酸ガスインキュベーターなどの湿式インキュベーター内であれば、ビーズ状ゲルを培養液に浸すことなく細胞を培養することができる。

【0011】本法により培養された細胞は、カルシウムイオンのキレート剤あるいはアルギン酸分解酵素を用いてアルギン酸ビーズ状ゲルを分解することにより回収することができる。例えばキレート剤としてはエチレンジアミン4酢酸(EDTA)、やエチレンジアミン4酢酸(EGTA)など容易に入手できる試薬が使用可能であり、これらの水溶液にアルギン酸ビーズ状ゲルを浸して37℃で10~20分培養後、軽くピペッティングすることによりアルギン酸ビーズ状ゲルは溶解し、内部の細胞を遠心操作により回収することができる。キレート剤の濃度は2mM~10mMが適当である。ピペッティング操作による損傷が顕著な細胞の場合には、温度を4℃に保ちキレート剤で最長12時間まで処理すること

もできる。またアルギン酸分解酵素としては海洋細菌、海産軟体動物より分離精製されるポリ(β-D-マンヌロネート)リアーゼ〔EC4.2.2.3.〕が有用である。回収した細胞は必要に応じて再培養することが出来る。

【0012】かくして培養したアルギン酸ビーズ状ゲル内の細胞は、そのままの形状で機能を保ちながら大量にしかも常温で輸送することができる。例えば100万個の細胞を常温で輸送するには、従来の技術では低面積25mm<sup>2</sup>(容量約60ml)の培養フラスコが10個程度必要であったが、本培養法を用いれば1個のビーズ状ゲルで500万個までの細胞を培養でき、その輸送には容量0.5mlの小形エッペンドルチューブ1本が必要

#### 実施例1 細胞を含むビーズ状ゲルの形成

成分	量
HeLa細胞(2×10 <sup>6</sup> 個/ml)	500μl
(培養液;イーグルMEM培地+5%牛胎児血清)	
1%アルギン酸/生理食塩水溶液(滅菌)	500μl

上記細胞とアルギン酸/生理食塩水溶液をエッペンドルフ型チューブ内で無菌的に穏やかに混和し、細胞/アルギン酸混和液を得た。この混和液を用量1mlのディスプレイシリンジ内に吸入し、シリンジ先端から15ml遠沈管中の0.5%塩化カルシウム溶液10mlに滴下し、細胞を含むアルギン酸ビーズ状ゲルを形成させた。37℃で30分培養後、上清を吸引して取り除き、培養液を2度交換してビーズ状ゲルを洗浄した後、再度培養液を加えて一昼夜培養し、ビーズ状ゲルを15ml遠沈管中、あるいはエッペンドルフ型チューブ中に移した後、常温で輸送した。

【0014】実施例2 ビーズ状ゲルからの細胞の回収  
実施例1の方法で形成した15ml遠沈管中のアルギン酸ビーズ状ゲルを一昼夜培養後、培養液を2mM EGTA溶液1mlに交換し、37℃で15分培養した。EGTA処理後のビーズ状ゲルを1mlのマイクロピペッターを用いて穏やかにピペッティングした後、培養液10mlを加え1200rpmで5分遠心して細胞を集め、培養液で再度細胞浮遊液とした後、培養用シャーレに細胞を植え、二次元培養を行なった。

【0015】本発明の効果を次の実験によって確認し

	培養方法	全細胞数	生細胞数	生存率
HeLa細胞	培養フラスコ	9.8×10 <sup>4</sup>	9.0×10 <sup>4</sup>	91.8%
	アルギン酸ビーズ	9.8×10 <sup>4</sup>	9.4×10 <sup>4</sup>	95.9%
線維芽細胞	培養フラスコ	9.9×10 <sup>4</sup>	9.1×10 <sup>4</sup>	91.9%
	アルギン酸ビーズ	9.8×10 <sup>4</sup>	9.0×10 <sup>4</sup>	91.8%
血管内皮細胞	培養フラスコ	9.2×10 <sup>4</sup>	8.2×10 <sup>4</sup>	89.1%
	アルギン酸ビーズ	9.4×10 <sup>4</sup>	8.6×10 <sup>4</sup>	91.5%

【0017】表1のごとく、細胞の常温輸送を仮定してアルギン酸ビーズ状ゲルで24時間室温放置された細胞は、培養フラスコ内で放置された細胞と同等もしくはそれ以上の生存率を示す。

なだけである。また要する培養液は従来法では総量600mlであるが、本培養法では0.5mlに過ぎない。このように本培養法を用いれば、輸送コスト、培養液費用とも大幅に削減できるのみならず、同一の細胞を大量にかつ多くの場所に安定して供給することが可能となる。さらに細胞機能評価に必要な試薬類、器具類と必要量の細胞を含むビーズ状ゲルを複数個組みあわせることにより、解凍や継代を必要とせず、培養場所のいかなを問わず同一条件で細胞機能評価のできる産業上有用なキットとして供給可能となる。

【0013】

【実施例及び比較例】次に実施例および実験を挙げて本発明をさらに詳細に説明する。

た。

実験1 24時間室温で放置後の生細胞数

細胞の常温輸送を仮定して、アルギン酸ビーズ状ゲル内で24時間室温放置された細胞の生存率を調べた。HeLa細胞、正常ヒト皮膚線維芽細胞、正常ヒト動脈血管内皮細胞とアルギン酸の混和液を実施例1の方法で準備し、その100μlをマイクロピペットで正確にとり、15ml遠沈管中の0.5%塩化カルシウム溶液10mlに滴下し、10<sup>5</sup>個の細胞を含むアルギン酸ビーズ状ゲルを形成させた。このビーズ状ゲルを一昼夜培養後、さらに室温で24時間放置した。次に実施例2の方法でEGTA処理により回収した細胞を培養液1mlで懸濁させ、トリパンブルー染色により生細胞と死細胞を分別して血球計算盤で細胞数を計測した。対照実験として、10<sup>5</sup>個の細胞を底面積25mm<sup>2</sup>の培養フラスコに播種し、一昼夜培養後、さらに室温で24時間放置した後、トリプシン・EDTAで細胞を回収し同様に細胞数を計測した。結果を表1に示す。

【0016】

【表1】

【0018】実験2 WST-1法によるアルギン酸ビーズ状ゲル内培養細胞の機能測定

ビーズ状ゲル内培養方法により供給された細胞をキットとしてそのまま機能評価に用いることを仮定して、ビー

ズ状ゲル内細胞の増殖活性がWST-1法により直接測定可能であるかを調べた。種々の細胞数のHeLa細胞、正常ヒト皮膚線維芽細胞、正常ヒト動脈血管内皮細胞を用いて、実施例1の方法で形成した15ml遠沈管中のアルギン酸ビーズ状ゲルを一昼夜培養後、96穴マルチプレートに1穴あたり1個ずつ播種し、100mlの培養液を加え、さらに37℃で30分培養した。次に50mMのWST-1 (C<sub>19</sub>H<sub>11</sub>IN<sub>5</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>Na)と2mMの1-MethoxyPMS (C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S)の200mM HEPESバッファー (pH 7.4) 混液10μlを各穴に加え、2時間培養後、450nmの吸光度を測定した。結果を図2に示す。図2のごとく、ビーズ状ゲル内培養方法により供給された細胞をキットとしてそのまま機能評価に用いることを仮定して、ビーズ状ゲルのまま計測されたWST-1値は、ビーズ状ゲル内の細胞数に依存して増加した。

【0019】実験3 ビーズ状ゲルより回収された細胞のコロニー形成能

	培養方法	コロニー数	コロニー形成率
			(plating efficiency)
HeLa細胞	培養フラスコ	95±2	95±2
	アルギン酸ビーズ	93±5	93±5
線維芽細胞	培養フラスコ	151±12	76±6
	アルギン酸ビーズ	156±16	78±8

【0021】表2のごとく、アルギン酸ビーズ状ゲルより回収された細胞は、培養フラスコより回収された細胞に等しいコロニー形成率を示した。

【0022】

【発明の効果】本発明によれば、培養細胞を大量に、安価に、かつ多くの場所に安定して供給することができ

アルギン酸ビーズ状ゲル内から回収された細胞の増殖活性を、コロニー形成法を用いてさらに詳細に調べた。10<sup>5</sup>個のHeLa細胞あるいは正常ヒト皮膚線維芽細胞を含むアルギン酸ビーズ状ゲルを実施例1の方法で形成させた。このビーズ状ゲルを一昼夜37℃で培養後、実施例2の方法でEGTA処理により細胞を回収し、血球計算盤を用いて生細胞数(トリパンブルー染色による)を計測した。次に培養液で各細胞を希釈し、6cmシャーレあたりHeLa細胞は100個、線維芽細胞は200個を播種した。HeLa細胞の場合は7日間、正常ヒト皮膚線維芽細胞の場合には2週間37℃で培養後、形成したコロニーをギムザ染色し、その数を計測した。対照実験として、10<sup>5</sup>個の細胞を底面積25mm<sup>2</sup>の培養フラスコに播種し、一昼夜培養後、トリプシン・EDTAで細胞を回収し同様にコロニー形成能を調べた。結果を表2に示す。

【0020】

【表2】

	培養方法	コロニー数	コロニー形成率
			(plating efficiency)
HeLa細胞	培養フラスコ	95±2	95±2
	アルギン酸ビーズ	93±5	93±5
線維芽細胞	培養フラスコ	151±12	76±6
	アルギン酸ビーズ	156±16	78±8

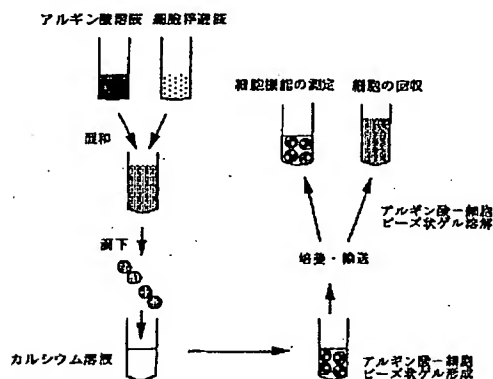
る。また解凍や継代を必要とせず、培養場所を問わず同一条件で細胞機能評価のできる培養細胞キットが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施の形態の模式図を示す。

【図2】実験2の測定結果を示す。

【図1】



【図2】

